

## ヒト大腸癌幹細胞における CDX2 の役割の解析

研究代表者： 青木耕史（医学部・教授）

研究分担者： 山口明夫（医学部・教授）・五井孝憲（医学部・准教授）

概 要	
これまでの我々の研究から、腸管上皮細胞の分化および恒常的機能の維持に不可欠なホメオボックス転写因子である <b>CDX1</b> と <b>CDX2</b> が大腸癌の悪性化や大腸癌細胞の幹細胞性を抑制していることが分かった。そこで、ヒト大腸癌の幹細胞性の制御における <b>CDX1</b> と <b>CDX2</b> の役割の解明を明らかにするために、ヒト大腸癌細胞から癌幹細胞を抽出（濃縮）して実験を進めることにした。そこで、まず、マウス腸腫瘍細胞から幹細胞を濃縮する実験系の構築を進めた。その結果、マウス腸腫瘍から、腫瘍幹細胞を濃縮する実験系を確立するとともに、 <b>CDX1</b> や <b>CDX2</b> が大腸腫瘍細胞の幹細胞性を抑制することを遺伝学的に示すことができた。一方で、当初予定していたヒト大腸癌細胞を用いた実験を開始することができなかった。今後、マウスの腸腫瘍細胞を用いて確立した実験系を利用して、ヒト大腸癌細胞を用いた研究を進める。	
関連キーワード	<b>CDX1</b> 、 <b>CDX2</b> 、大腸癌幹細胞性、大腸癌悪性化

### 研究の背景および目的

研究の背景) 近年大腸癌への罹患率が男性・女性ともに、増加しており、大腸癌を標的にした新たな治療標的の同定が課題となっている。そのためには、大腸癌の悪性化進展の機序解明が不可欠である。

これまでの解析から我々は、腸管の上皮細胞に特異的に発現しているホメオボックス転写因子である **CDX2** が大腸腫瘍形成の初期段階を抑制することなどを見出した。さらに、培養細胞やマウスの遺伝学手法を用いた解析から **CDX2** やそのファミリー分子である **CDX1** が、大腸癌細胞の悪性化

を抑制していることを明らかにした (Hori and Aoki *et al.*, unpublished)。また、その機序解析を進めることにより、**CDX1** と **CDX2** が大腸癌細胞の幹細胞性を抑制していることを見出した。

研究の目的) **CDX1** および **CDX2** によるヒト大腸癌細胞の癌幹細胞性の制御機構を明らかにするために、ヒト大腸癌からの癌幹細胞培養系の確立と、ヒト大腸癌細胞における **CDX1** と **CDX2** の役割の解明を目的として以下の実験を進めた。

### 研究の内容および成果

研究内容) 本研究課題では、ヒト大腸癌から、癌幹細胞を濃縮することが必要である。そこで、マウスの腸管腫瘍から腫瘍幹細胞を濃縮する実験の確立を進めた。スフェロイド培養系は、近年確立された幹細胞の培養方法である。ここでは、スフェロイド培養系を幹細胞培養系と呼ぶ。

また、マウスの腸腫瘍幹細胞培養系を用いて、**Apc** 遺伝子変異マウス、**cis-ApcCdx1** 遺伝子変異マウス、**Cdx2-cis-ApcCdx1** 遺伝子変異マウスの腸腫瘍から腫瘍幹細胞を培養

し、**CDX1** と **CDX2** が大腸腫瘍の腫瘍幹細胞の制御における役割の解明を進めた。

結果 1) 各遺伝子変異マウスの大腸腫瘍細胞からの幹細胞培養系の確立。

まず、それぞれの遺伝子変異マウスの大腸腫瘍から幹細胞の培養系の確立を行った。それぞれの大腸腫瘍から細胞を抽出し、マトリゲル中で、**Wnt** シグナルを活性化する組換えタンパク質を含む **conditioned** 培養液で培養した。図 1 の **poly#1** のように、**conditioned** 培養液を添加した状態では、正

常幹細胞が混在することが分かった（腫瘍細胞では、*Cdx1* 遺伝子の正常型が欠失する）。これは、このスフェロイド培養系が、正常腸上皮細胞の幹細胞の培養用に開発されたためである。そこで、conditioned 培養液を除いた培養液で一定期間培養した。その結果、conditioned 培養液を除くと正常幹細胞の増殖が抑制されるため、腫瘍幹細胞のみのスフェロイドが増殖した。そこで、これらの材料を用いて、次の実験を行った。

結果 2) *Cdx1* および *Cdx2* の欠損により大腸腫瘍細胞の腫瘍幹細胞性が上昇する。

これまでの解析から、ヒト大腸癌細胞株を用いた cDNA マイクロアレイ法による遺伝子発現の解析から、CDX1 と CDX2 がヒト大腸癌細胞株の癌幹細胞性に関わる遺伝子の発現を顕著に低下することが分かった。この結果をマウスの遺伝学的手法を用いて、証明を試みた。*Apc* 遺伝子変異マウス、*cis-ApcCdx1* 遺伝子変異マウス、*Cdx2-cis-ApcCdx1* 遺伝子変異マウスの大腸に生じた大腸腫瘍から、スフェロイド培養を行った。図 2 に示すように、*Cdx2-cis-ApcCdx1* 遺伝子変異マウスの大腸腫瘍幹細胞は、*Apc* 遺伝子変異マウスの腫瘍細胞に比べて、増殖性が高い傾向があることがわかった（図 2: 球体の数が多い；現在、定量解析を進めている）。

そこで、腫瘍幹細胞のマーカー分子として最も重要な *Lgr5* 遺伝子の発現量を解析した。その結果、*Apc* 遺伝子変異マウスよりも、*Cdx2-cis-ApcCdx1* 遺伝子変異マウス由来の腫瘍幹細胞では、*Lgr5* 遺伝子発現量が、2 倍程度高いことがわかった（図 3）。すなわち、CDX1 と CDX2 が腫瘍細胞の幹細胞性を抑制していることが強く示唆された。今

後、ヒト大腸癌由来の細胞においても同様の解析を進める。

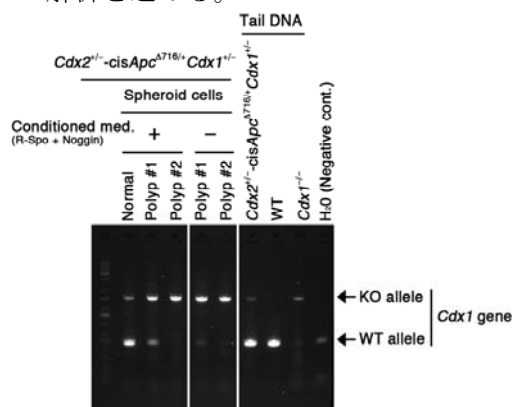


図 1. スフェロイド細胞での遺伝子型の解析

Spheroid cells derived from colonic tumors

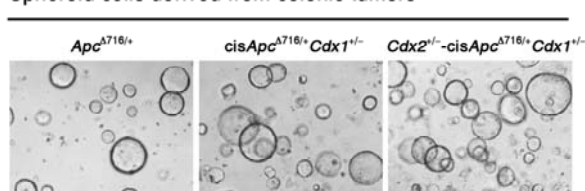


図 2. 各遺伝子変異マウスの腫瘍幹細胞

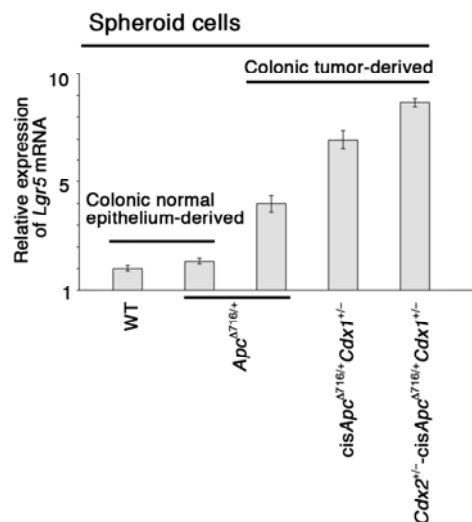


図 3. 腫瘍幹細胞での LGR5 遺伝子発現解析

## 本助成による主な発表論文等、特記事項および競争的資金・研究助成への申請・獲得状況

### 「主な発表論文等」

- 1) Reducing DNA methylation suppresses colon carcinogenesis by inducing tumor cell differentiation. Hatano Y, Semi K, Hashimoto K, Lee MS, Hirata A, Tomita H, Kuno T, Takamatsu M, **Aoki K**, Taketo MM, Kim YJ, Hara A, Yamada Y *Carcinogenesis*, Vol. 36(7), 719-729 2015
- 2) Hori K and **Aoki K** (corresponding au.), et al., Suppression of intestinal cancer stemness and

malignant progression by intestine-specific homeoproteins CDX1 and CDX2 (投稿準備中)

### 「特記事項」なし

### 「競争的資金・研究助成への申請・獲得状況」

- 1) 公益財団法人持田記念医学薬学振興財団・研究助成金・代表・2015 年度・大腸癌細胞の幹細胞性の制御機構の解明・300 万円
- 2) 公益財団法人がん研究振興財団・代表・2015 年度・大腸癌細胞の幹細胞性の制御機構の解明・100 万円